

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: C12N 15/12, 15/11, C07K 14/82, 14/47, A61K 31/70, 38/17 // 48/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/27008 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. September 1996 (06.09.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/00351		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 26. Februar 1996 (26.02.96)		
(30) Prioritätsdaten: 195 08 734.8 28. Februar 1995 (28.02.95) DE 195 39 130.6 20. Oktober 1995 (20.10.95) DE		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V., BERLIN [DE/DE]; Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE).		
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): STRAUSS, Michael [DE/DE]; Parkstrasse 3, D-13187 Berlin (DE). BARTEK, Jiri [CZ/DK]; Strandlyst Alle 14, DK-2670 Greve (DK). LUKAS, Jiri [CZ/DK]; Laerkemosen 10, DK-2670 Greve (DK). SANDIG, Volker [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 1, D-13125 Berlin (DE).		
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		

(54) Title: **AGENT FOR TREATING TUMOURS AND OTHER HYPERPLASIA**

(54) Bezeichnung: **MITTEL ZUR THERAPIE VON TUMOREN UND ANDEREN HYPERPLASIEN**

(57) Abstract

The invention concerns an agent for treating tumours and other hyperplasia. Areas of application of the invention include medicine and the pharmaceutical industry. The agent according to the invention is characterized in that it comprises: a tumour suppressor gene co-operating with the tumour suppressor Rb; an antisense or ribozyme sequence active against antagonistic kinases or cyclines; or another substance which inhibits phosphorylation of the Rb protein.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Therapie von Tumoren und anderen Hyperplasien. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie. Das erfindungsgemäße Mittel ist dadurch gekennzeichnet, daß es ein mit dem Tumorsuppressor Rb kooperierendes Tumorsuppressor, eine antisense- oder Ribozym-Sequenz gegen antagonistische Kinasen bzw. Cycline oder eine andere die Phosphorylierung des Rb-Proteins hemmende Substanz enthält.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
RJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LJ	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estonien	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Mittel zur Therapie von Tumoren und anderen Hyperplasien**B schreibung**

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Therapie von Tumoren und anderen Hyperplasien. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Es existiert bereits eine Vielzahl von Mitteln gegen Tumorwachstum und Hyperplasien, wobei es sich in der Regel um Substanzen handelt, die in irgendeiner Weise in den Zellstoffwechsel eingreifen und Tumorzellen mehr oder weniger selektiv abtöten. Diese sogenannten Chemotherapeutika haben sich bei einigen wenigen Tumorkrankheiten, wie z.B. Leukämien, als besonders wirksam erwiesen, sind aber bei den meisten Tumorerkrankungen nur unbefriedigend wirksam und mit zu vielen Neben-

wirkungen behaftet. Das Konzept der Gentherapie hat in den letzten 5 Jahren die Strategien zur Tumortherapie revolutioniert. Mit Genen und deren Produkten einen selektiven Effekt auf das Wachstum von Tumoren aber auch anderen Hyperplasien, wie z.B. der Gefäßmuskelzellproliferation nach Verletzung durch Kathedereingriffe, auszuüben, ist das Ziel dieser Strategien.

Eine bereits erfolgreich umgesetzte Strategie besteht in der selektiven Abtötung proliferierender Zellen durch Einbringen eines Gens, dessen Produkt (Enzym) ein zunächst ungiftiges Chemotherapeutikum in ein Produkt umwandelt, das selektiv toxisch auf Tumorzellen wirkt. (Moolten, F.L. et al. /1990/ Human Gene Therapy 1, 125-134; Culver, K.W. et al. /1992/ Science 256, 1550-1552)

Die Gene, welche hierfür Anwendung finden, sind das Thymidinkinase (tk)-Gen von Herpes simplex Viren sowie das bakterielle Cytosin-Desamin Gen. Die Thymidinkinase wandelt das Nukleosid Ganciclovir in das toxische Triphosphat um, welches nach Einbau in die DNA replizierender Zellen zum Kettenabbruch und damit zum Zelltod führt. Der große Vorteil dieser Methode gegenüber der klassischen Chemotherapie besteht in der

Selektivität des toxischen Effekts. Dabei ist es nicht erforderlich, daß alle Tumorzellen mit dem tk Gen transduziert werden, da das Ganciclovir über sogenannte "gap junctions" an benachbarte Zellen weitergegeben wird, aber nur wachsende Zellen vergiften kann. Dieser Effekt wird "bystander" genannt (Ram, Z. et al. /1993/ Cancer Res. 53, 83-88).

Es hat sich aber gezeigt, daß eine größere Zahl von Tumoren resistent gegenüber dem "bystander" Effekt ist. Darüber hinaus ist die Toxizität des Ganciclovir für den Patienten nicht zu unterschätzen. Daher wird intensiv nach alternativen Gentherapie-Strategien für die Tumortherapie gesucht.

Ein kürzlich beschrittener Weg basiert auf der Einführung sogenannter Tumorsuppressoren in die proliferierenden Zellen mit Hilfe effektiver viraler Vektoren (Bacchetti, S. und Graham, F.L. /1993/ Int. J. Oncol. 3, 781-788; Zhang, W.W. et al. /1994/ Cancer Gene Therapy 1, 5-13).

Die beiden bisher verwendeten Tumorsuppressoren sind das p53-Gen und das Rb-Gen. Beide kodieren Repressoren der Zellteilung. Ihr Hemmeffekt auf die Zellteilung ist aber nur bei solchen Tumoren zu erreichen, die einen Defekt in den endogenen Tumorsuppressoren aufweisen. Dies sind beim Rb-Gen etwa 15% und beim p53-Gen etwa 50%.

Dabei sind Punktmutanten des Rb-Gen dominant gegenüber dem Normalprotein, d.h. in Tumorzellen muß wesentlich mehr Protein vom eingebrachten Normalgen exprimiert werden als vom endogenen Mutanten, um einen Hemmeffekt zu erzielen.

Die Zellteilungsforschung hat in den letzten Jahren zur Entdeckung zahlreicher positiver und negativer Regulatoren der Zellteilung geführt. Positive Regulatoren sind die sogenannten Cykline und die mit ihnen komplexierten Cyklin-abhängigen Kinasen (cdK); negative Regulatoren sind die Kinase-Inhibitoren (Sherr, C.J. /1994/ Cell 79, 551-555).

Die Erfindung hat das Ziel, ein neues Mittel zur Therapie von Tumoren und anderen Hyperplasien bereitzustellen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, ein Mittel zu entwickeln, daß das Teilungswachstum von Tumoren oder anderen hyperplastischen Zellen hemmt.

Die Erfindung wird gemäß Anspruch 1 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten. Das erfindungsgemäße Mittel ist dadurch gekennzeichnet, daß es

- ein mit dem Tumorsuppressor Rb kooperierendes Tumorsuppressorgen,
- eine antisense- oder Ribozym-Sequenz gegen antagonistische Kinasen bzw. Cycline oder
- eine andere die Phosphorylierung des Rb-Proteins hemmende Substanz enthält.

Das Wesen des Mittels besteht darin, daß ein Gen, welches für die Bildung eines cdk-Inhibitors kodiert, oder eine antisense-Sequenz bzw. ein Ribozym gegen eine mRNA für ein G1-Phase-spezifisches Cyklin oder eine cdk in einem geeigneten Vektor kloniert vorliegt und für den Gentransfer in Tumorzellen oder andere hyperplastische Zellen eingesetzt wird. Als Vektoren finden bevorzugt solche Verwendung, die eine 100%ige Infektion des Zielgewebes erlauben. Solche Vektoren sind zum Beispiel vom Adenovirus abgeleitet und durch Verwendung eines geeigneten Promoters spezifisch für das Tumorgewebe.

Bevorzugte kooperierende Tumorsuppressorgene sind MTS-1 (p16) und MTS-2 (p15).

Im Falle des Einsatzes von antisense- oder Ribozym-Sequenzen werden bevorzugt solche Sequenzen gewählt, die gegen die mRNA der Kinasen cdk2, cdk4, cdk5 oder cdk6 bzw. der Cycline D1, D2, D3 oder E gerichtet ist. Die Erfindung umfaßt auch

Sequenz n, die gegen die Promotoren der cdks oder von Cyclinen gerichtet ist.

Im Falle vom phosphorylierungshemmenden Substanzen kommen vorzugsweise solche zum Einsatz, die spezifisch die Kinasen cdk4 oder cdk6 hemmen.

Die antisense- oder Ribozymsequenz wird gemäß der Erfindung bevorzugt synthetisch hergestellt und als Oligonukleotid eingesetzt.

- Besonders bevorzugt sind die antisense-Sequenzen
- gegen die mRNA von cdk2 der Bausteinreihenfolge 5'
GAAGTTCTCCATGAAG 3',
 - gegen die mRNA von cdk4 der Bausteinreihenfolge 5'
CTCACCATGTGACC 3',
 - gegen die mRNA von cdk6 der Bausteinreihenfolge 5'
CCGTCCTTCTCCATG 3',
 - gegen die mRNA von Cyclin D1 der Bausteinreihenfolge 5'
AGGAGCTGGTCTTCCATG 3',
 - gegen die mRNA von Cyclin D2 der Bausteinreihenfolge 5'
TGGCACAGCAGCTCCATG 3',
 - gegen die mRNA von Cyclin D3 der Bausteinreihenfolge 5'
AACACAGCAGCTCCATAAC 3' und
 - gegen die mRNA von Cyclin E der Bausteinreihenfolge 5'
CCGCTCCTTCGCATC 3'.

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform der Erfindung besteht in der Kombination eines mit dem Tumorsuppressor Rb kooperierenden Tumorsuppressorgens, einer antisense- oder Ribozym-Sequenz gegen antagonistische Kinasen bzw. Cycline bzw. einer anderen die Phosphorylierung des Rb-Proteins hemmenden Substanz mit dem p53-Gen. Dadurch wird neben der cytostatisch effektiven Abtötung der Tumorzellpopulation erreicht.

Besonders bevorzugt ist die Kombination des kooperierenden

Tumorsuppressorgens MTS-1 (p16) mit dem p53-Gen.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Beispiele

1. Expression von antisense - RNA gegen Cyclin D1

Die komplette cDNA des humanen Cyclin D1-Gens wird in antisense-Orientierung hinter den CMV-Promoter in pX kloniert. Diese Rekombinante wird in verschiedene Tumorzelllinien transfiziert, und zwar zusammen mit dem Markergen CD20. Nach 48 Std. werden die Zellen durch Trypsinierung von den Kulturschalen abgelöst und im Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer nach 2 Parametern analysiert:

1. Präsenz von CD20 (zeigt erfolgreich transfizierte Zellen an);
2. DNA-Profil (Phasenverteilung).

Ein typisches Ergebnis ist in Tabelle 1 dargestellt:

<u>Zelllinie</u>		<u>Kontrollsektor</u>			<u>antisense D1</u>		
		G1	S	G2/M	G1	S	
<u>G2/M</u>							
SaOS-2 (Rb)		51	31	18	52	32	16
BT549 (Rb)		51	36	13	56	32	12
U205 (RB)		50	37	13	84	16	0
MCF-7 (Rb)		58	29	13	92	8	0
SK-LMS-1 (Rb)		56	30	14	82	18	0

Das Ergebnis zeigtindeutig einen hemmenden Effekt der antisense-D1-Konstruktion auf den Übergang der Zellen in die S-Phase, allerdings nur in Rb-positiven Zellen, was darauf

hindeut t, daß Cyclin D1 die Präsenz von Rb benötigt, um seine stimulierend Wirkung auf die Zellteilung auszuüben.

2. Transfer des p16-Gens in Tumorzellen

Die cDNA für p16 wird hinter den CMV-Promoter in pX kloniert. Die resultierende Rekombinante wird in verschiedene Tumorzelllinien zusammen mit dem CD20-Gen transfiziert. Nach 48 Std. werden die Zellen im FACS auf CD20-Expression selektiert und das DNA-Profil aufgenommen. Ein typisches Ergebnis ist in Abbildung 1 dargestellt. Das Ergebnis zeigt einen eindeutigen Hemmeffekt auf den Übergang in die S-Phase bei Rb-positiven Zellen unter Verwendung des normalen p16-Gens. Ein als Kontrolle dienendes mutiertes p16-Gen, das aus einer Tumorlinie isoliert wurde, hatte dagegen keinen Hemmeffekt.

3. Transfer des p16-Gens durch einen Adenovirusrektor

Die cDNA des humanen p16-Gens wird unter Kontrolle des CMV-Promoters in das Adenovirus-Transferplasmid p E1sp1A kloniert. Dieses Plasmid wird gemeinsam mit dem Helferplasmid pJM17 durch Ca⁺⁺-Kopräzipitation in HEK 293-Zellen transfiziert. Durch homologe Rekombination zwischen beiden Plasmiden entstehende El-defiziente Viren werden Plaque gereinigt und durch PCR-Amplifikation und Restriktaseverdau überprüft. Nach Vermehrung auf HEK 293-Zellen wird ein gereinigter Virusstock durch Auftrennung des Zelllysates im CsCl₂-Gradienten gewonnen. Der Virusstock wird mittels Plaqueassay getitert. Für verschiedene Tumorzelllinien wird die effektive Virusmenge/Zelle (MOI) durch Infektion mit einem β-Galaktosidase-exprimierenden Adenovirus und histochemischen Nachweis des Enzyms bestimmt.

Die Tumorzelllinien Hu H7, Lovo, MCF7 (p16-) sowie H pG2, BT 549 und C33A (p16+) werden mit Ad p16 bzw. Ad βgal infiziert und p16 im Westernblot nachgewiesen. Die virusvermittelte p16-Expression übersteigt das endogene Niveau in H pG2, BT 549 und

C33A-Z 11 n mind stens 5fach. Die Expression von p16 verhindert eine Anreicherung der phosphorylierten Form von Rb. (Abb. 2)

Die Infektion mit Ad p16 bewirkt in Zellen mit funktionellen Rb einen Wachstumsstop, während die Infektion mit Ad Bgal nur zu einer Verlangsamung des Zellzyklus führt. Bei der Analyse des DNA-Profiles im FACS ist in Rb positiven Zellen eine Hemmung beim Übergang in die S-Phase zu verzeichnen (Abb. 3).

Patentansprüche

1. Mittel zur Therapie von Tumoren und anderen Hyperplasien, gekennzeichnet dadurch, daß es ein mit dem Tumorsuppressor Rb kooperierendes Tumorsuppressorgen, eine antisense- oder Ribozym-Sequenz gegen antagonistische Kinasen bzw. Cycline oder eine andere die Phosphorylierung des Rb-Proteins hemmende Substanz enthält.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das kooperierende Tumorsuppressorgen MTS-1 (p16) ist.
3. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das kooperierende Tumorsuppressorgen MTS-2 (p15) ist.
4. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die antisense- oder Ribozym-Sequenz gegen die mRNA der Kinasen cdk2, cdk4, cdk5 oder cdk6 gerichtet ist.
5. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die antisense- oder Ribozym-Sequenz gegen die mRNA der Cycline D1, D2, D3 oder E gerichtet ist.
6. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die antisense-Sequenz gegen die Promotoren der cdks oder Cycline gerichtet ist.
7. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die phosphorylierungshemmende Substanz spezifisch die Kinasen cdk4 oder cdk6 hemmt.
8. Mittel nach Anspruch 1 und 2 bzw. 3, dadurch gekennzeichnet, daß die cDNA für p16 bzw. p15 mit einem Promotor in ein geeigneten Vektor vorliegt.

9. Mittel nach Anspruch 1 und 4 bzw. 5, dadurch gekennzeichnet, daß die antisense- oder Ribozymsequenz als DNA in einem Expressionsvektor vorliegt.
10. Mittel nach Anspruch 1 und 4 bzw. 5, dadurch gekennzeichnet, daß die antisense- oder Ribozymsequenz synthetisch hergestellt und als Oligonukleotid eingesetzt wird.
11. Mittel nach Anspruch 1, 4 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die antisense-Sequenz gegen die mRNA von cdk2 die Bausteinreihenfolge 5'GAAGTTCTCCATGAAG 3' aufweist.
12. Mittel nach Anspruch 1, 4 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die antisense-Sequenz gegen die mRNA von cdk4 die Bausteinreihenfolge 5'CTCACCATGTGACC 3' aufweist.
13. Mittel nach Anspruch 1, 4 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die antisense-Sequenz gegen die mRNA von cdk6 die Bausteinreihenfolge 5'CCGTCCCTCTCCATG 3' aufweist.
14. Mittel nach Anspruch 1, 5 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die antisense-Sequenz gegen die mRNA von Cyclin D1 die Bausteinreihenfolge 5'AGGAGCTGGTCTTCATG 3' aufweist.
15. Mittel nach Anspruch 1, 5 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die antisense-Sequenz gegen die mRNA von Cyclin D2 die Bausteinreihenfolge 5'TGGCACAGCAGCTCCATG 3' aufweist.
16. Mittel nach Anspruch 1, 5 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die antisense-Sequenz gegen die mRNA von Cyclin D3 die Bausteinreihenfolge 5'AACACAGCAGCTCCATAC 3' aufweist.
17. Mittel nach Anspruch 1, 5 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die antisense-Sequenz gegen die mRNA von Cyclin E die Bausteinreihenfolge 5'CCGCTCCTTCGCATC 3' aufweist.

18. Mittel nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es ein mit dem Tumorsuppressor Rb kooperierendes Tumorsuppressorgen, eine antisense- oder Ribozym-Sequenz gegen antagonistische Kinasen bzw. Cycline oder eine andere die Phosphorylierung des Rb-Proteins hemmende Substanz in Kombination mit dem p53-Gen enthält.

19. Mittel nach Anspruch 1 und 18, dadurch gekennzeichnet, daß es das kooperierende Tumorsuppressorgen MTS-1 (p16) in Kombination mit dem p53-Gen enthält.

1/3

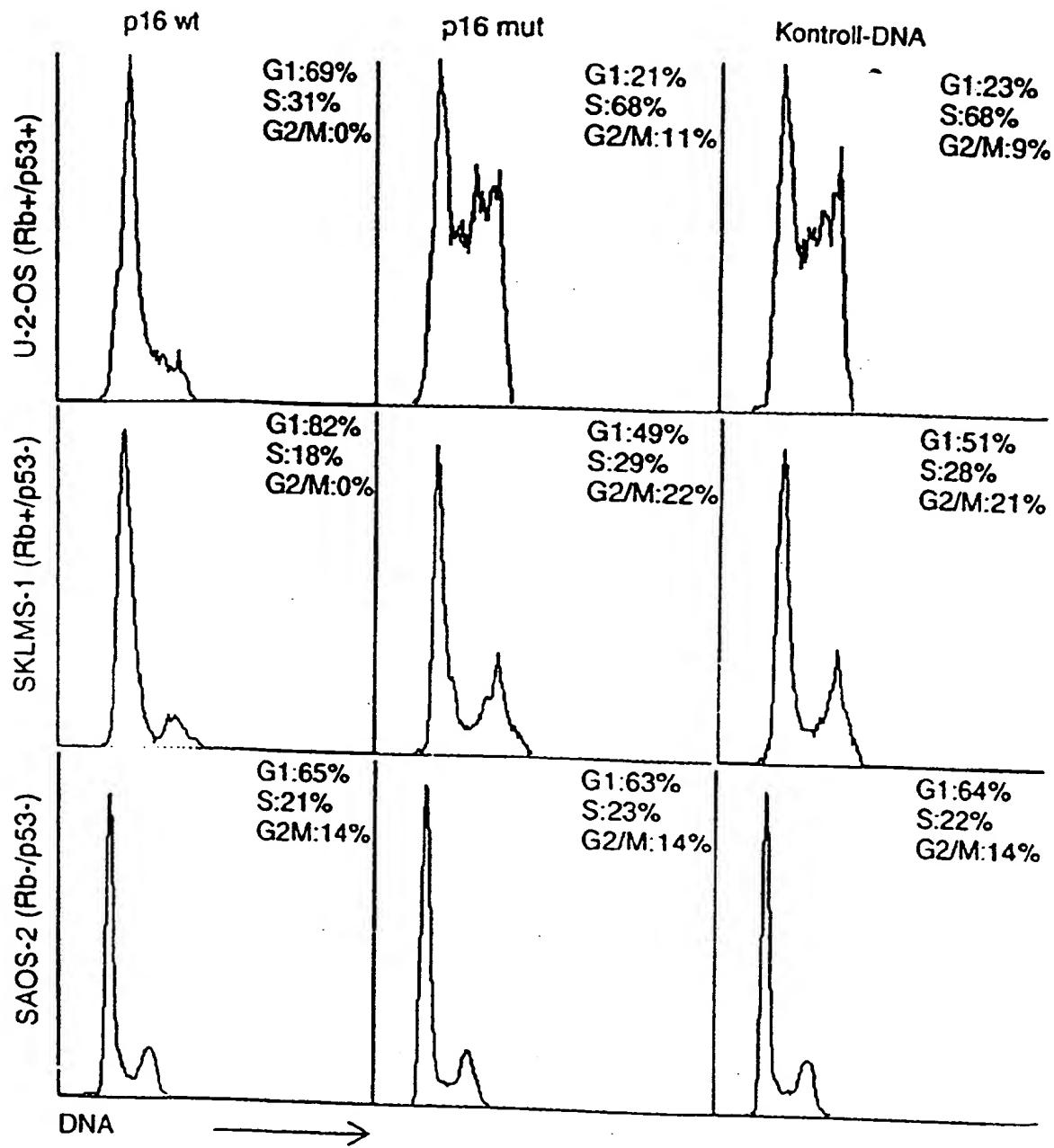
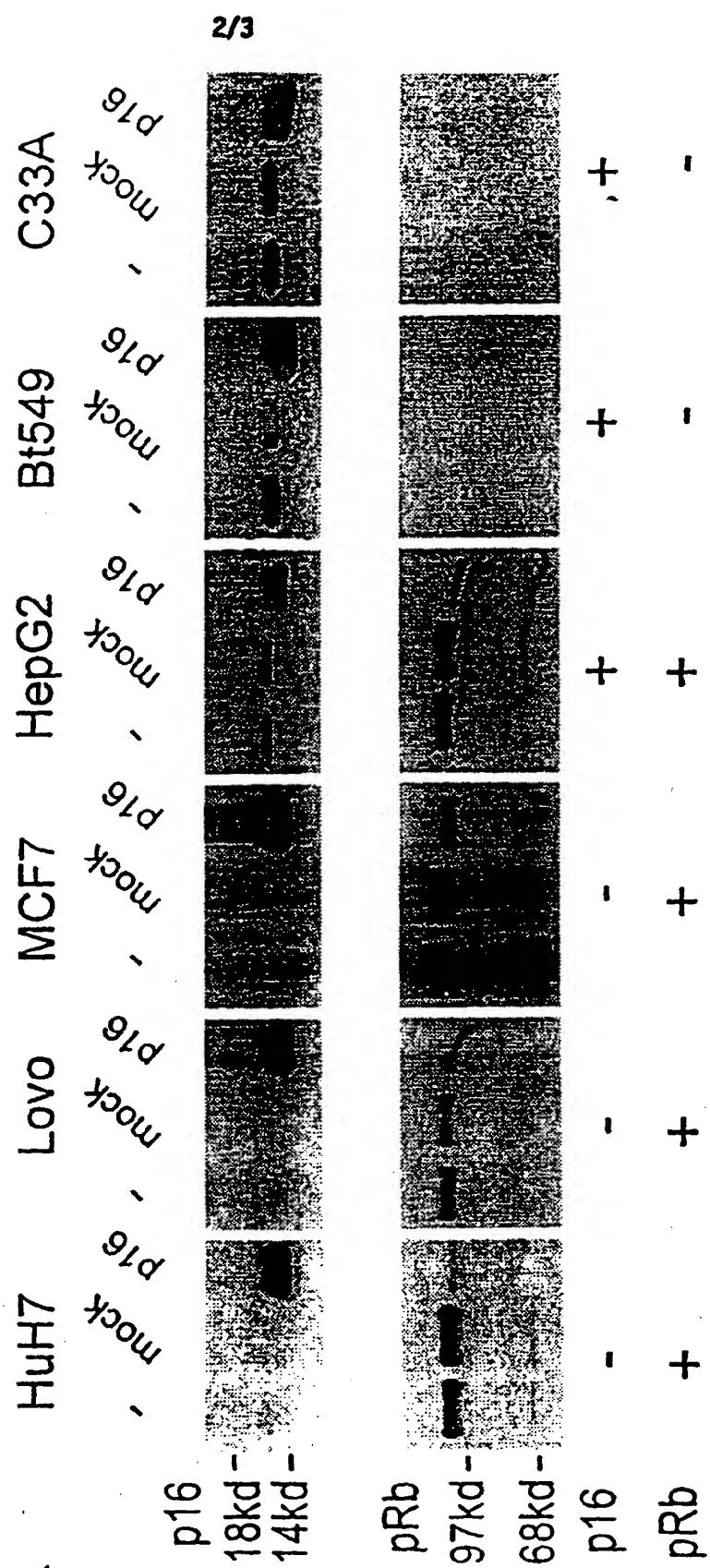


Abb. 1

p16 and Rb Status in Tumor-Zelllinien nach Adp16 Infektion

Abb. 2



3/3

HuH7-Zellen nach Adp16-Infektion

FACSS-Analyse des Zellzyklus

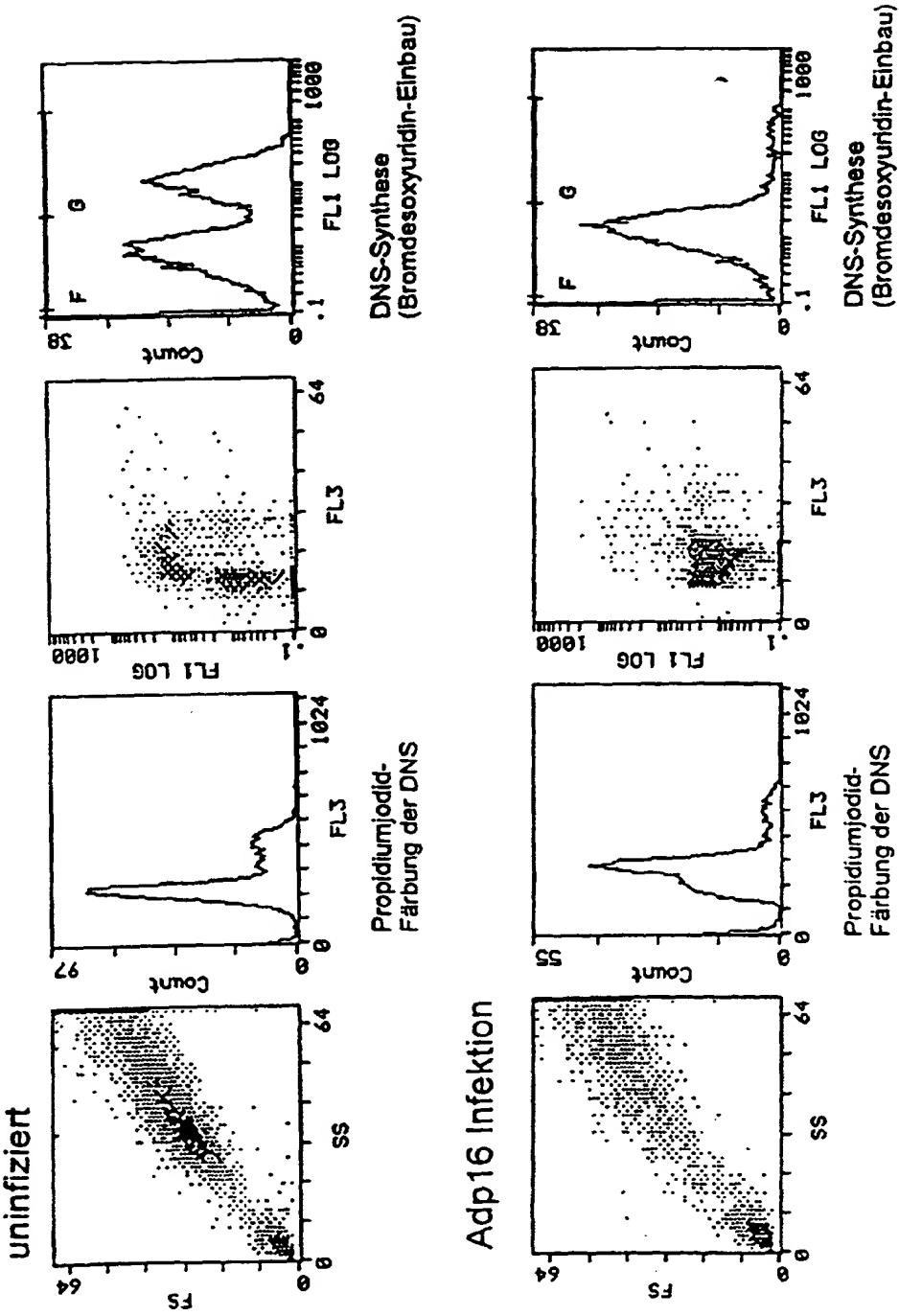


Abb. 3



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/12, 15/11, C07K 14/82, 14/47, A61K 31/70, 38/17, C07H 21/00 // A61K 48/00		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/27008 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. September 1996 (06.09.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/00351 (22) Internationales Anmeldedatum: 26. Februar 1996 (26.02.96)		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 14. November 1996 (14.11.96)	
(30) Prioritätsdaten: 195 08 734.8 28. Februar 1995 (28.02.95) DE 195 39 130.6 20. Oktober 1995 (20.10.95) DE			
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V., BERLIN [DE/DE]; Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): STRAUSS, Michael [DE/DE]; Parkstrasse 3, D-13187 Berlin (DE). BARTEK, Jiri [CZ/DK]; Strandlyst Alle 14, DK-2670 Greve (DK). LUKAS, Jiri [CZ/DK]; Laerkemosen 10, DK-2670 Greve (DK). SANDIG, Volker [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 1, D-13125 Berlin (DE).			
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).			

(54) Title: AGENT FOR TREATING TUMOURS AND OTHER HYPERPLASIA

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR THERAPIE VON TUMOREN UND ANDEREN HYPERPLASIEN

(57) Abstract

The invention concerns an agent for treating tumours and other hyperplasia. Areas of application of the invention include medicine and the pharmaceutical industry. The agent according to the invention is characterized in that it comprises: a tumour suppressor gene co-operating with the tumour suppressor Rb; an antisense or ribozyme sequence active against antagonistic kinases or cyclines; or another substance which inhibits phosphorylation of the Rb protein.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Therapie von Tumoren und anderen Hyperplasien. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie. Das erfindungsgemäße Mittel ist dadurch gekennzeichnet, daß es ein mit dem Tumorsuppressor Rb kooperierendes Tumorsuppressorgen, eine antisense- oder Ribozym-Sequenz gegen antagonistische Kinasen bzw. Cycline oder eine andere die Phosphorylierung des Rb-Proteins hemmende Substanz enthält.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Amenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irländ	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estonia	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/DE 96/00351

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/12 C12N15/11 C07K14/82 C07K14/47 A61K31/70
A61K38/17 C07H21/00
//A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K C07H C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NATURE, vol. 371, 15 September 1994, LONDON GB, pages 257-261, XP002008793 HANNON, G. & BEACH, D.: "p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest" see the whole document ---	1-3,7,8
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, June 1994, WASHINGTON US, pages 5320-5324, XP002008794 SLEBOS, R. ET AL.: "p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein" see the whole document ---	18,19
Y	-/-	18,19

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

'&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
---	--

18 July 1996

23.08.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HJ Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ANDRES S.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 96/00351

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NATURE, vol. 366, 16 December 1993, LONDON GB, pages 704-707, XP002008795 SERRANO, M. ET AL.: "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4" see the whole document ---	1,2,7,8
P,X	WO 96 03875 A (UNIV EMORY) 15 February 1996 see examples 6-8 see claims 16-21 ---	1,2,8
P,X	WO 95 28483 A (COLD SPRING HARBOR LAB) 26 October 1995 see page 3, line 20 - page 7, line 21 see page 20, line 11 - page 22, line 33 see page 46, line 11 - page 48, line 12 see examples ---	1-3,7,8
E	WO 96 15245 A (ARCH DEV CORP ;LEIDEN JEFFREY M (US); BARR ELIAV (US)) 23 May 1996 see page 8, line 18 - page 9, line 22 see examples 5,6 ---	1,2
T	NATURE, (1995 JUN 8) 375 (6531) 503-6, XP002008796 LUKAS, J. ET AL.: "Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16." see the whole document ---	1,2
X	EMBO JOURNAL, (1995 FEB 1) 14 (3) 503-11., XP002008797 PARRY, D. ET AL.: "Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb -negative cells correlates with high levels of p16INK4 / MTS1 tumour suppressor gene product." see the whole document ---	1,2,7,8
X	CANCER RESEARCH, (1995 FEB 1) 55 (3) 505-9., XP002008798 SHAPIRO, G. ET AL.: "Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines." see the whole document ---	1,2,7,8
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/DE 96/00351

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 3, no. 5, November 1993, pages 781-788, XP000576129 BACCHETTI, S. & GRAHAM, F.: "Inhibition of cell proliferation by an adenovirus vector expressing human wild type p53 protein" cited in the application ---</p>	
A	<p>WO 93 20691 A (TYKOCINSKI MARK L ;ILAN JOSEPH (US)) 28 October 1993 ---</p>	
T	<p>MOLECULAR CARCINOGENESIS 16 (1). 1996. 53-60, XP000576136 SPILLARE, E. ET AL.: "Suppression of growth in vitro and tumorigenicity in vivo of human carcinoma cell lines by transfected p16-INK4." see the whole document -----</p>	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 96/00351**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 4 inventions

- see further information PCT/ISA/210

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

2,3,8,19 (in full) and 1,7,18 (in part)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE 96/00351

1. Claims 2-3, 8, 19 (in full) and 1, 7, 18 (in part):
therapeutic agent to treat tumors and other hyperplasia,
containing an Rb-cooperative tumor suppressor gene.
2. Claims 4, 11-13 (in full) and 1, 6, 9-10, 18 (in part):
therapeutic agent to treat tumors and other hyperplasia,
containing an antisense or ribozyme sequence against
antagonistic kinases.
3. Claims 5, 14-17 (in full) and 1, 6, 9-10, 18 (in part):
therapeutic agent to treat tumors and other hyperplasia,
containing an antisense and ribozyme sequence against
antagonistic cyclins.
4. Claims 1, 7, 18 (all in part):
therapeutic agent to treat tumors and other hyperplasia,
containing an Rb phosphorylation-inhibiting substance
(where not belonging to one of the other invention groups 1-
3).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 96/00351

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9603875	15-02-96	AU-A-	3071995	04-03-96
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9528483	26-10-95	AU-A-	2384595	10-11-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9615245	23-05-96	AU-A-	4502096	06-06-96
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9320691	28-10-93	AU-A-	4106393	18-11-93
		EP-A-	0637201	08-02-95
		JP-T-	7506002	06-07-95
-----	-----	-----	-----	-----

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE 96/00351
--

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/12 C12N15/11 C07K14/82 C07K14/47 A61K31/70 A61K38/17 C07H21/00 //A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
IPK 6 C12N A61K C07H C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NATURE, Bd. 371, 15.September 1994, LONDON GB, Seiten 257-261, XP002008793 HANNON, G. & BEACH, D.: "p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest" siehe das ganze Dokument ---	1-3,7,8
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 91, Juni 1994, WASHINGTON US, Seiten 5320-5324, XP002008794 SLEBOS, R. ET AL.: "p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein" siehe das ganze Dokument ---	18,19
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 91, Juni 1994, WASHINGTON US, Seiten 5320-5324, XP002008794 SLEBOS, R. ET AL.: "p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein" siehe das ganze Dokument ---	18,19
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 18.Juli 1996	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 23.08.96
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter ANDRES S.M.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/00351

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NATURE, Bd. 366, 16. Dezember 1993, LONDON GB, Seiten 704-707, XP002008795 SERRANO, M. ET AL.: "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4" siehe das ganze Dokument ---	1,2,7,8
P,X	WO 96 03875 A (UNIV EMORY) 15. Februar 1996 siehe Beispiele 6-8 siehe Ansprüche 16-21 ---	1,2,8
P,X	WO 95 28483 A (COLD SPRING HARBOR LAB) 26. Oktober 1995 siehe Seite 3, Zeile 20 - Seite 7, Zeile 21 siehe Seite 20, Zeile 11 - Seite 22, Zeile 33 siehe Seite 46, Zeile 11 - Seite 48, Zeile 12 siehe Beispiele ---	1-3,7,8
E	WO 96 15245 A (ARCH DEV CORP ; LEIDEN JEFFREY M (US); BARR ELIAV (US)) 23. Mai 1996 siehe Seite 8, Zeile 18 - Seite 9, Zeile 22 siehe Beispiele 5,6 ---	1,2
T	NATURE, (1995 JUN 8) 375 (6531) 503-6, XP002008796 LUKAS, J. ET AL.: "Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16." siehe das ganze Dokument ---	1,2
X	EMBO JOURNAL, (1995 FEB 1) 14 (3) 503-11., XP002008797 PARRY, D. ET AL.: "Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb -negative cells correlates with high levels of p16INK4 / MTS1 tumour suppressor gene product." siehe das ganze Dokument ---	1,2,7,8
X	CANCER RESEARCH, (1995 FEB 1) 55 (3) 505-9., XP002008798 SHAPIRO, G. ET AL.: "Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines." siehe das ganze Dokument ---	1,2,7,8
1		-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen	PCT/DE 96/00351
------------------------------	-----------------

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, Bd. 3, Nr. 5, November 1993, Seiten 781-788, XP000576129 BACCHETTI, S. & GRAHAM, F.: "Inhibition of cell proliferation by an adenovirus vector expressing human wild type p53 protein" in der Anmeldung erwähnt</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 93 20691 A (TYKOCINSKI MARK L ;ILAN JOSEPH (US)) 28.Okttober 1993</p> <p>---</p>	
T	<p>MOLECULAR CARCINOGENESIS 16 (1). 1996. 53-60, XP000576136 SPILLARE, E. ET AL.: "Suppression of growth in vitro and tumorigenicity in vivo of human carcinoma cell lines by transfected p16-INK4." siehe das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1,2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

I - nationales Aktenzeichen

PCT/DE96/00351

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

- 4 Erfindungen
- Siehe weitere Angaben PCT/ISA/210 -
1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.

 2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

 3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

 4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
2,3,8,19 (vollständig) und 1,7,18 (teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE96/00351

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/
1.	Ansprüche 2-3, 8, 19 (vollständig) und 1, 7, 18 (teilweise): Mittel zur Therapie von Tumoren und anderen Hyperplasien, dass ein mit Rb-kooperierendes Tumorsuppressorgen enthält
2.	Ansprüche 4, 11-13 (vollständig) und 1, 6, 9-10, 18 (teilweise): Mittel zur Therapie von Tumoren und anderen Hyperplasien, dass eine Antisense- oder Ribozym-Sequenz gegen antagonistische Kinasen enthält
3.	Ansprüche 5, 14-17 (vollständig) und 1, 6, 9-10, 18 (teilweise): Mittel zur Therapie von Tumoren und anderen Hyperplasien, dass eine Antisense- oder Ribozym-Sequenz gegen anagonistische Cycline enthält
4.	Ansprüche 1, 7, 18 (alle teilweise): Mittel zur Therapie von Tumoren und anderen Hyperplasien, dass eine Rb Phosphorylierungs-hemmende Substanz (soweit nicht zur einer anderen der Erfindungsgruppen 1 bis 3 gehörend) enthält.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/00351

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9603875	15-02-96	AU-B- 3071995	04-03-96
WO-A-9528483	26-10-95	AU-B- 2384595	10-11-95
WO-A-9615245	23-05-96	AU-B- 4502096	06-06-96
WO-A-9320691	28-10-93	AU-B- 4106393 EP-A- 0637201 JP-T- 7506002	18-11-93 08-02-95 06-07-95

